

УДК: 616-018.74-008.7

ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У КРЫС

А.И. Маяков¹
М.В. Покровский²
Т.Г. Покровская²
А.С. Белоус²
А.А. Арустамова¹
М.В. Корокин²
О.С. Гудырев²
М.В. Маякова²

¹Белгородский
государственный
университет

²Курский
государственный
медицинский
университет

e-mail: facies@yandex.ru

Эндотелиальную дисфункцию моделировали посредством билатеральной овариэктомии самок, крыс линии Wistar и в течение 6 недель добавлением в корм фруктозы, удельный вес которой составляет 60% от общего рациона, а также внутривенным введением стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг, однократно в течение 5 суток. При этом степень развития эндотелиальной дисфункции оценивали по коэффициенту эндотелиальной дисфункции, а формирование метаболических нарушений по изменению уровня гликемии в оральном тесте толерантности к глюкозе. Данная модель может быть использована для оценки фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции при воспроизведении метаболических нарушений у крыс.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, стрептозотоцин, фруктозосодержащая диета, метаболические нарушения, инсулинорезистентность.

Введение. Сахарный диабет (СД) является одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения многих стран [7, 8, 21]. Каждые 10-15 лет число больных СД удваивается [11, 19]. При СД нарушаются большинство видов метаболизма и в разной степени поражаются многие ткани и органы. Развитие СД приводит к появлению серьезных осложнений, являющихся причиной инвалидности и высокой смертности. Артериальная гипертензия (АГ) и эндотелиальная дисфункция (ЭД), которая отмечается у 80% пациентов с СД, является самостоятельными факторами, оказывающим непосредственное влияние на развитие и прогрессирование микроваскулярной патологии [3, 12, 15]. Общность метаболических расстройств, возникающих при СД, ЭД и АГ, способствует отягощению течения осложнений каждой патологии в отдельности. Инсулинорезистентность (ИР) и, как следствие, компенсаторная гиперинсулинемия, имеющая место у подавляющего большинства пациентов с СД, ведет к росту симпатической активности с увеличением сердечного выброса и повышению общего периферического сопротивления сосудов, пролиферации гладкомышечных клеток сосудов, росту внутриклеточного содержания Na и Ca, что сопровождается формированием ЭД и усугублением АГ [13, 14]. Предотвращение развития и дальнейшего прогрессирования микроваскулярной патологии диктует необходимость поиска новых звеньев патогенеза и возможных факторов, влияющих на пути их формирования.

Целью настоящего исследования явилось изучение стрептозотоцин – индуцированной эндотелиальной дисфункции.

Методика исследования. Опыты проводились на 30-ти половозрелых белых самках линии Wistar массой 250-300 г. В первый день эксперимента у самок под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) хирургическим путем вскрывали брюшную полость и удаляли оба яичника. В дальнейшем на протяжении 6 недель в корм животных добавляли фруктозу, удельный вес которой равен 60% от общего рациона пищи. На 6-ой неделе эксперимента в вену хвоста в течение 5 суток вводили стрептозотоцин в дозе 45 мг/кг, однократно. Ежедневно, однократно, в утреннее время, натощак, в течение всего срока эксперимента измеряли уровень глюкозы в крови, взятой из вены хвоста животных, при помощи глюкометра Satellit Plus (Россия). На 6-й неделе эксперимента проводился тест толерантности к глюкозе, натощак, путем орального введения глюкозы (1 мг/кг) и регистрации уровня глюкозы на протяжении 120 минут при помощи глюкометра Satellit Plus (Россия). В течение кормления ежедневно измеряли показатели артериального давления с использованием неинвазивного датчика измерения кровяного давления у

мелких животных на хвосте Doc-NIBP200A, производства Biopac System, Inc., США. На 42-й день от начала эксперимента под наркозом (этаминал-натрия 50 мг/кг) вводили катетер в правую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД), болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в левую бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли непрерывно посредством датчика TSD104A аппаратно-программного комплекса MP100, производства Biopac System, Inc., США. Проводили следующие функциональные сосудистые пробы – эндотелийзависимая вазодилатация (ЭЗВ) с внутривенным введением ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг и эндотелийнезависимая вазодилатация (ЭНЗВ) с внутривенным введением нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг. Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД), представляющее собой отношение площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение НП (ЭНВД) к площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение АХ (ЭЗВД) [4].

Результаты подвергали статистической обработке путем расчета средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$) и оценки достоверности различий сравниваемых параметров с использованием t-test для групп с равной дисперсией, уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования. Экспериментальные исследования проводили на следующих группах животных: интактные (И) – животные, у которых проводилась ложная операция (вскрытие брюшной полости с последующим ушиванием); животные с билатеральной овариэктомией (БО), получавших обычный пищевой рацион; животные с билатеральной овариэктомией, которым давалась фруктозосодержащая диета и на 6-ой неделе эксперимента внутривенно вводился стрептозотоцин (БОФС). Измерение уровня глюкозы натощак на протяжении 6 недель не выявило изменения значений в первых двух из указанных выше групп животных относительно нормальных показателей. В группе БОФС данный показатель был достоверно выше и составил в среднем $11,1 \pm 1,3$ ммоль/л.

При проведении теста толерантности к глюкозе на 6-ой неделе эксперимента, наблюдался стойкий уровень гликемии к 120 минуте в группе БОФС относительно групп И и БО, этот показатель был достоверно выше и составил $13,7 \pm 0,7$ ммоль/л. В группе И и БО таковые значения глюкозы крови приближались к исходным на 120 минуте и составляли – $4,8 \pm 0,2$ и $4,6 \pm 1,2$ ммоль/л соответственно (рис. 1).

При проведении исследований на наркотизированных животных с инвазивным определением параметров гемодинамики получили следующие данные: болюсное внутривенное введение АХ в течение 3-5 сек приводило к резкому падению артериального давления, достигающего пика у ложнооперированных животных (для систолического артериального давления (САД) $84,3 \pm 4,4$, для диастолического артериального давления (ДАД) – $38,7 \pm 2,8$ и для среднего артериального давления (СрАД) $53,9 \pm 2,7$ мм рт. ст.). При этом в течение первых 2-3 сек развивалась резкая брадикардия до 130-150 ударов в минуту. Восстановление АД происходило в среднем за $42,2 \pm 0,8$ сек. после нормализации сердечного ритма. ЭНЗВ также характеризовалась снижением САД до $83,0 \pm 3,7$, ДАД до $42,1 \pm 4,4$ и СрАД до $55,7 \pm 3,5$ мм рт.ст. с последующим полным восстановлением в среднем в течение $45,1 \pm 1,0$ сек.

У животных с билатеральной овариэктомией, получавших обычный рацион, через 6 недель отмечалось достоверное увеличение цифр АД: САД – $160,0 \pm 6,2$; ДАД – $124,9 \pm 5,5$; СрАД – $135,9 \pm 5,0$ мм рт. ст. по сравнению с интактной группой животных. ЭЗВ и ЭНЗВ характеризовались достоверно меньшим снижением.

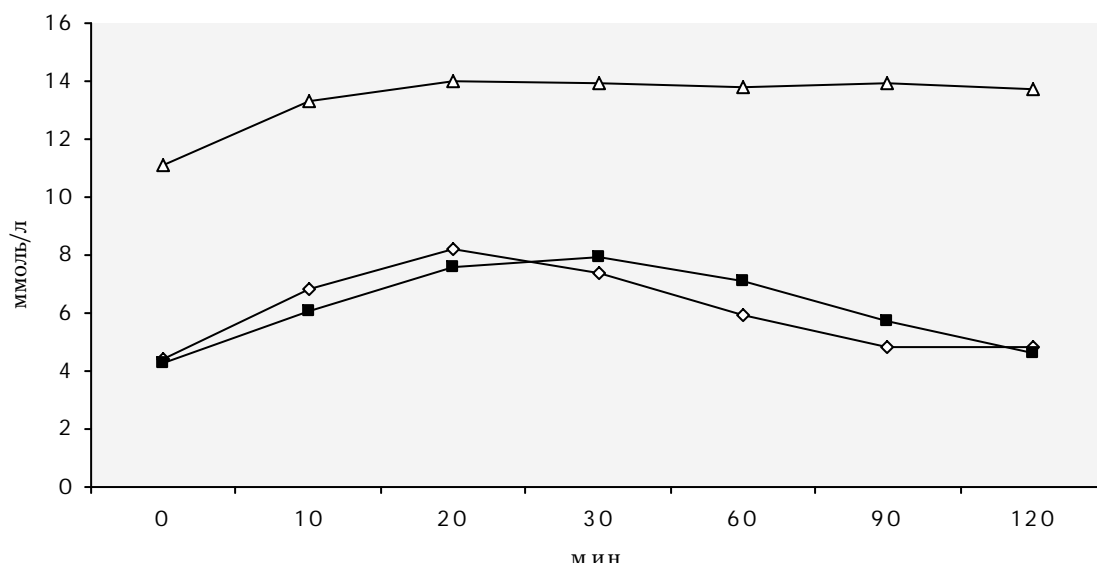


Рис. 1. Динамика уровня глюкозы плазмы крови крыс в пероральном тесте толерантности глюкозы на 6-й неделе эксперимента

На рисунке изображено:

- △ – группа животных с билатеральной овариэктомией, получавших фруктозосодержащую диету и внутривенное введение стрептозотоцина;
- – группа животных с билатеральной овариэктомией, получавших обычный рацион;
- ◇ – интактная группа.

Измерение уровня среднего артериального давления неинвазивным способом выявило достоверное его повышение в группах БО и БОФС, по сравнению с интактными животными начиная с 4-ой недели развития патологии, и составило на 6-ой неделе $159,5 \pm 4,6$ и $178,6 \pm 4,5$ мм рт.ст. соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Динамика уровня среднего артериального давления, определяемого неинвазивным способом, при моделировании стрептозотин-индуцированной эндотелиальной дисфункции ($n=10$, $M \pm m$, мм рт.ст.)

Группы животных	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	5 нед.	6 нед.
Интактные (И)	$136,7 \pm 3,4$	$136,6 \pm 3,4$	$136,9 \pm 3,6$	$136,8 \pm 3,5$	$136,9 \pm 3,6$	$137,1 \pm 3,6$
Билатеральная овариэктомия (БО)	$135,8 \pm 3,3$	$141,2 \pm 3,9$	$147,4 \pm 4,1^*$	$153,9 \pm 4,4^*$	$157,1 \pm 4,2^*$	$159,5 \pm 4,6^*$
Билатеральная овариэктомия + Фруктозосодержащая диета + Стрептозотин (БОФС)	$135,1 \pm 3,1$	$141,3 \pm 4,1$	$148,5 \pm 4,8^*$	$154,7 \pm 3,5^*$	$162,3 \pm 4,4^*$	$178,6 \pm 4,5^*$

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных.

Ежедневное, однократное, внутривенное введение стрептозотоцина в течение 5 суток и фруктозосодержащая диета на фоне гипозестрогении спустя 6 недель вызывало значимую артериальную гипертензию (САД – $175,1 \pm 3,7$, ДАД – $123,7 \pm 6,1$, СрАД – $149,4 \pm 5,2$ мм рт. ст.) и приводила к меньшему снижению показателей АД после введения АХ (САД до $85,2 \pm 2,7$, ДАД до $56,4 \pm 4,8$, СрАД до $70,8 \pm 2,7$ мм рт. ст.) и НП (САД до $96,1 \pm 9,4$, ДАД до $53,4 \pm 5,3$ и СрАД до $74,7 \pm 4,7$ мм рт. ст.) по сравнению с интактными животными и животными с билатеральной овариэктомией, получавших обычный рацион. Восстановление АД при введении АХ и НП происходило в среднем за $37,7 \pm 4,4$ сек и $105,1 \pm 10,4$ сек после нормализации сердечного ритма соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Показатели, отражающие степень эндотелиальной дисфункции на фоне

стрептозотоцин-индуцированной модели (n=10, M±m)

Группы животных	Функциональные пробы	Прирост падения сосудистой реакции по СрАД (мм рт.ст.)	Время сосудистой реакции (сек.)	Площадь сосудистой реакции (усл. ед.)	Отношение площадей сосудистой реакции АХ к НП
Интактные (И)	АХ	59,9±2,9	42,2±0,8	1268,0±74,8	1,1±0,1
	НП	61,0±3,0	45,1±1,0	1375,3±93,7	
Билатеральная овариэктомия (БО)	АХ	67,8±7,3	33,0±5,4	1022,5±131*	2,1±0,2*
	НП	70,0±6,0	46,0±4,5	2157,3±167*	
Билатеральная овариэктомия + Фруктозосодержащая диета + Стрептозотоцин (БОФС)	АХ	70,8±2,7	37,7±4,4	1312,2±237,2	2,8±0,2**
	НП	74,7±4,7	105,1±10,4	3674,1±642,1	

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных;

** – $p < 0,05$ в сравнении с группой животных, у которых проводилась билатеральная овариэктомия и получавших обычный пищевой рацион.

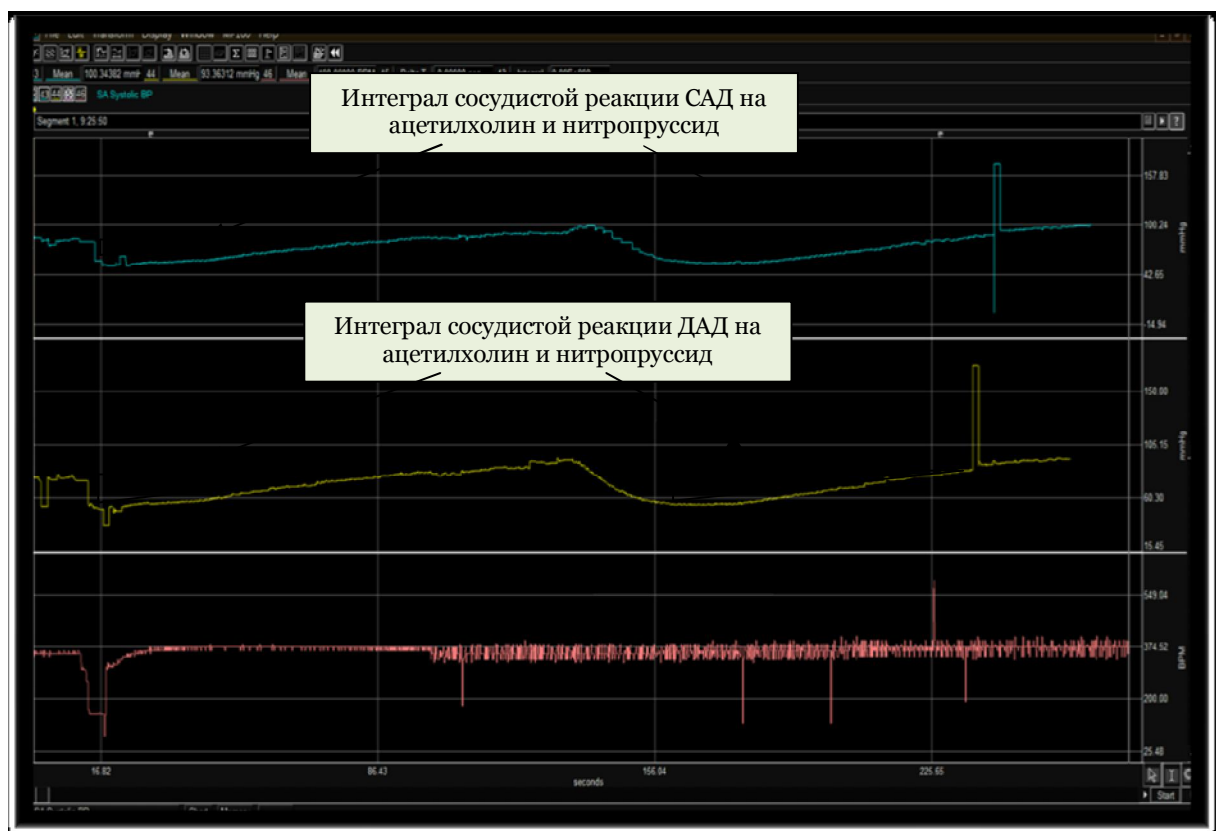


Рис. 2. Показатели сосудистой реакции у интактных животных

Значения КЭД составили: $1,1 \pm 0,1$ – в группе интактных животных, $2,1 \pm 0,2$ – в группе животных с билатеральной овариэктомией, получавших обычный пищевой рацион, а в группе животных с билатеральной овариэктомией, которым проводилась фруктозосодержащая диета и внутривенно вводился стрептозотоцин, – $2,8 \pm 0,2$, что достоверно больше в сравнении с вышеуказанными группами (рис. 2, 3, 4).

Обсуждение. Известно, гипеоэстрогения, которая возникает в менопаузе, играет роль пускового фактора в развитии комплекса тесно связанных между собой метаболических нарушений [2, 4, 10]. Это позволило ряду авторов предложить для обозначения этого состояния термин "менопаузальный метаболический синдром" [15, 17, 18]. Он включает в себя:

1. Развитие дислипотеинемии, которая определяет до 30% заболеваний сердечно-сосудистой системы в постменопаузе. В этот период происходит дисбаланс между атерогенными липопротеинами (липопротеинами низкой плотности — ЛПНП) и антиатерогенными липопротеинами (липопротеинами высокой плотности — ЛПВП), что активирует атерогенез в артериальной стенке.

2. Развитие инсулинорезистентности и гиперинсулинемии является одним из патогенетических механизмов менопаузального метаболического синдрома. Параллельно развитию гипоестрогенемии происходит снижение чувствительности периферических тканей к инсулину, с формированием резистентности, что ведет к повышению его уровня в крови. Следствием чего может быть развитие сахарного диабета II типа. Инсулинорезистентность оказывает неблагоприятное влияние на эндотелий сосудов, активирует пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток, процесс липогенеза в сосудистой стенке, угнетает процессы фибринолиза, ведет к повышению артериального давления вследствие резистентности сосудов, негативно влияет на распределение жировой ткани.

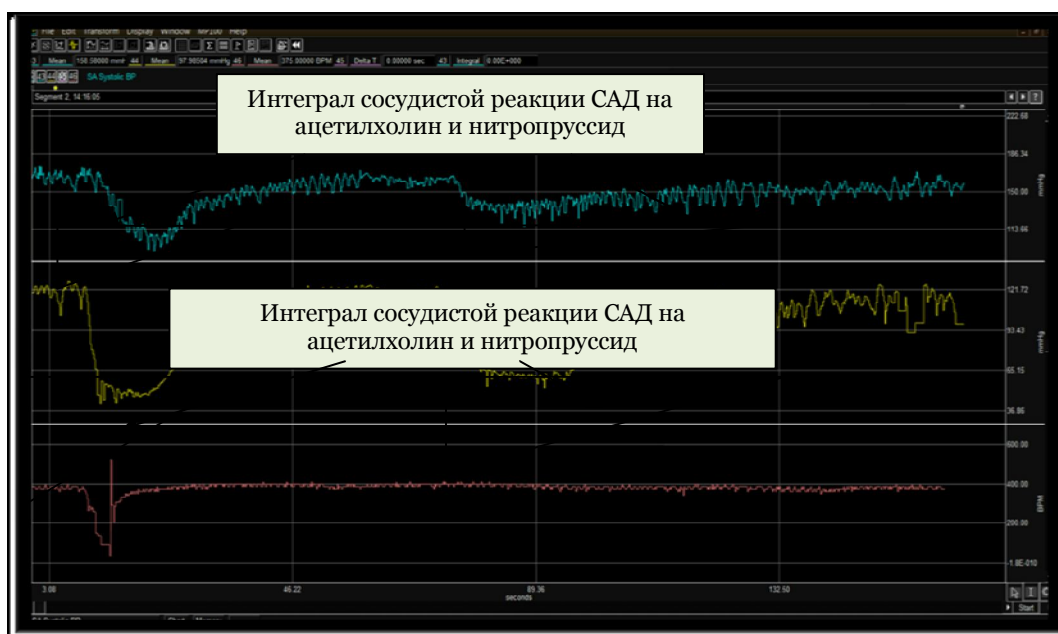


Рис. 3. Показатели сосудистой реакции у животных, которым проводилась билатеральная овариэктомия

При этом многие женщины подходят к периоду менопаузы с имеющимися заболеваниями эндокринной системы [5]. Коморбидность климактерического синдрома и заболеваний эндокринной системы, в том числе развивающийся инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД), создает условия для возможного взаимоотягощения, маскировки клинических проявлений заболеваний или изменения течения основного эндокринного заболевания как самого по себе, так и на фоне лечения.

Как известно, инсулинзависимый сахарный и экспериментальный диабет (стрептозотоцин-индуцированный диабет, мыши линии NOD, C57B1, BB-крысы) является аутоиммунным заболеванием, с прогрессирующей деструкцией b-клеток и развитием абсолютной инсулиновой недостаточности [10, 13].

Ямамото и соавторы продемонстрировали, что в обработанных стрептозотоцином островковых клетках поджелудочной железы ингибирование ПАРП 3-аминобензамидом предотвращает падение уровня Н А Д и подавление проинсулинового синтеза без изменения уровня повреждений ДНК. Основываясь на этих наблюдениях, логично предположить, что образование единичных разрывов ДНК, вызванных генерацией NO и пероксинитрита, лежит в основе активации ПАРП и последующего повреждения островковых клеток в ответ на действие стрептозотоцина. В соответствии с этим островковые клетки, полученные из

дефицитных по гену ПАРП мышей, в сравнении с островковыми клетками дикого типа устойчивы к повреждениям, вызываемым NO- и генераторами пероксинитрита [6, 16].

Проведенные исследования показали также, что ПАРП вовлекается в различные типы других локальных или системных воспалительных состояний. В моделях, связанных с экспрессией изоформ NO-синтаз и продукцией пероксинитрита, ингибирование ПАРП 3-аминобензамидом приводят к утрате способности кровеносных сосудов реагировать на вазоконстрикторные агенты (васкулярная гипореактивность), миокардиальной дисфункции и ослабляет внутриклеточные энергетические процессы, что заканчивается многочисленными органическими повреждениями. Эксперименты на грызунах показали, что активация ПАРП играет важную роль в патогенезе сосудистой недостаточности и клеточной энергетической дисфункции – эндотелиальной дисфункции [20].

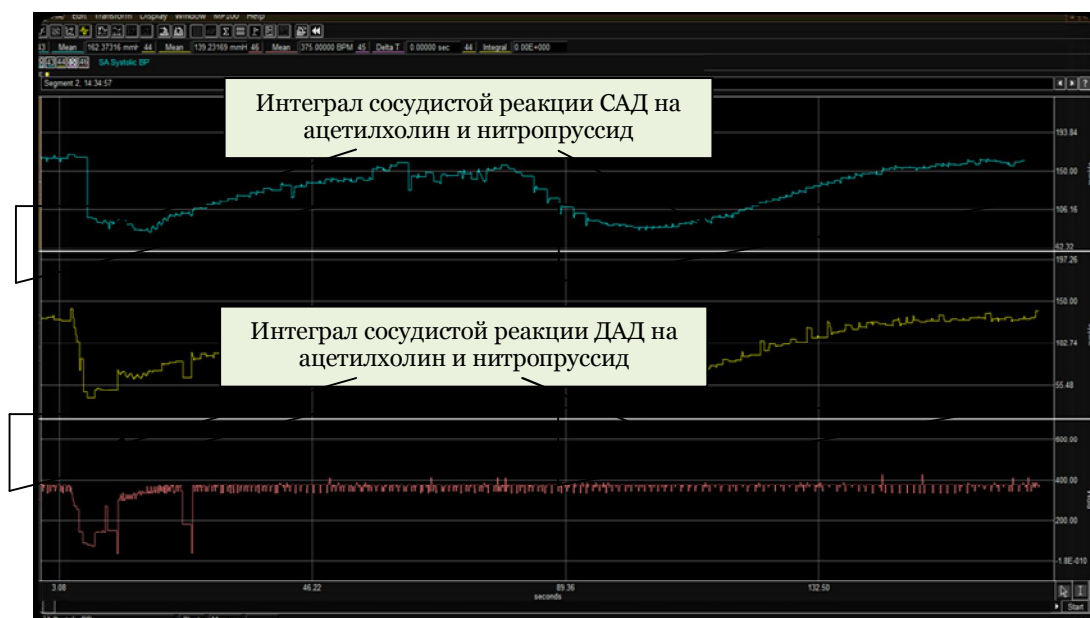


Рис. 4. Показатели сосудистой реакции стрептозотоцин-индуцированной эндотелиальной дисфункции

В результате настоящего исследования выявлено достоверное повышение коэффициента эндотелиальной дисфункции, отражающего степень развития дисфункции эндотелия, в группе животных с билатеральной овариэктомией, которым проводилась фруктозосодержащая диета и вводился стрептозотоцин, по сравнению с группой интактных животных. Оценка метаболических нарушений по изменению уровня гликемии к 120-й минуте в оральном тесте толерантности к глюкозе выявило формирование гипергликемического ответа в этой же группе животных по сравнению с другими исследуемыми группами.

Таким образом, стрептозотоцин-индуцированная модель развития эндотелиальной дисфункции на фоне воспроизведения метаболических нарушений может быть использована для оценки фармакологической коррекции.

Литература

1. Балаболкин, М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Кремская. — М.: Медицина, 2005. — 512 с.
2. Вихирева, О.В. Артериальная гипертензия: проблемы и решения / О.В. Вихирева // Международный медицинский бюллетень. — 2003. — № 15. — С. 17.
3. Галенок, В.А. Тер. Архив. / В.А. Галенок, Е.А. Жук //Терапевтический Архив. — 1995. — № 12. -С.80-84.
4. Дедов, И.И. Эндокринология / И.И. Дедов, И.А. Абугова, М.Ш. Шамхалова // Пробл. эндокринол. — № 4. — С.43-48.
5. Дедов, И.И. Кардиоренальный синдром при сахарномдиабете 1-го типа: роль

дисфункции эндотелия. / И.И. Дедов, А.А. Александров, М.В. Шестакова // *Kardiologia*. – 2005. – № 6. – С. 35-41.

6. Дзяк, Г.В. Вплив дефіциту естрогенів та заміної гормональної терапії на функцію серцево-судинно у системи / Г.В. Дзяк, З.М. Дубоссарська // *ПАГ*. – 1999. – № 2. – С. 77-81.

7. Маяков, А.И. Эндотелиальная дисфункция на фоне фруктоз-индуцированной модели метаболических нарушений у крыс / А.И. Маяков, Т.Г. Покровская, М.В. Покровский // XVII Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство». Сборник материалов конгресса. – М. – 2010. – С. 676-677.

9. Маяков, А.И. Фруктоз-индуцированная модель эндотелиальной дисфункции у крыс / А.И. Маяков, К.А. Шуклина, В.Ю. Цепелев // *Материалы 74-й межвузовской итоговой научной конференции студентов и молодых ученых: Молодежная наука и современность, посвященной Году молодежи в России. 21-22 апреля 2009 года. В 3-х частях. Часть II.* – Курск: ГОУ ВПО КГМУ. – 2009. – С. 193.

10. Патент С 22301015 RU А 61 В5/02. Способ оценки эндотелиальной дисфункции / Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. // № 2005113243/14; Заявл. 04.05.2005/17 Изобретения (Заявки и патенты). – 2007. – №17.

11. Покровский, М.В. Новый взгляд на коррекцию эндотелиальной дисфункции / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская // *Российский журнал иммунологии*. – М. – 2006. – Т. 9. – С. 60-61.

12. Покровский, М.В. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская // *Кубанский научно-медицинский вестник*. – Краснодар. – 2006. – №10. – С.72-77.

13. Профилактика сахарного диабета: Доклад исследовательской группы ВОЗ. (Сер. техн. докл. ВОЗ 844) – Женева, 1995.

14. Bersofsky, J.A. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure / J.A. Bersofsky. *Science*. – 1985. – V. 229. – No4717. – P. 939-940.

15. Golay, A. Effect of obesity on ambient plasma glucose, free fatty acid, insulin, growth hormone, and glucagon concentrations / A. Golay, A.L.M. Swislocki, Y.D.I. Chen, J.B. Jaspan et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1986. – №63. – P.481-484.

16. Meredith, I.T. Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestations of coronary artery disease / I.T. Meredith, A.C. Yeung, F.F. Weidinger et al. // *Circulation*. – 1993. – №87 (S.V). – P. 56-66.

17. Schiffrin, E.L. Angiotensin II Receptor antagonists Eds. M. Epstein, H.R. Brunner / E.L. Schiffrin, D. Hayoz // Philadelphia: Hanley Belfus INC. – 2001. – P.279- 289.

18. Stratton, I.M. Endothelium dysfunction: endocrinology diseases / I.M. Stratton, A.L. Adler, H.A. Neil et al. // *BMJ*. – 2000. – V. 321. – P. 405–412

19. Ubink-Veltman, L.J. Prevalence, incidence and mortality of type 2 diabetes mellitus revisited: a prospective population-based study in the Netherlands (ZODIAC-1) / L.J. Ubink-Veltman, H.J. Bilo, K.H. Groenier et al. // *Eur J Epidemiol*. – 2003. – №18(8). – P. 793-800.

REPRODUCTION OF THE STREPTOZOTOTSIN-INDUCED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AT RATS

A.I. Mayakov¹
M.V. Pokrovsky²
T.G. Pokrovskaya²
A.S. Belous²
A.A. Arustamova¹
M.V. Korokin²
O.S. Gudyrev²
M.V. Mayakova²

¹⁾ **Belgorod State University**

²⁾ **Kursk State Medical University**

e-mail: facies@yandex.ru

Endothelial dysfunction modelled by means of bilateral ovariectomy females, rats of line Wistar and within 6 weeks addition in the fructose forage which specific gravity makes 60 % from the general ration, and also intravenous introduction streptozototsin in a dose of 45 mg/kg, unitary within 5 days. Thus degree of development of endothelial dysfunction estimated on factor of endothelial dysfunction, and formation of metabolic disturbances on change of level of a glycemia in an oral glucose loading. The given model can be used for an estimation of pharmacological correction of endothelial dysfunction at reproduction of metabolic disturbances at rats.

Key words: endothelial dysfunction, streptozototsin, fructose diet, metabolic disturbances, insulin resistance.